Die Sterine und Bufadienolide der Haut von *Bufo formosus* BOULENGER

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

ERNST ISELI
aus Basel

1963

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG.
1965

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546021_0018

Die Sterine und Bufadienolide der Haut von *Bufo formosus* BOULENGER

Verkürzte Fassung der

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

ERNST ISELI
aus Basel

Basel
Buchdruckerei Birkhäuser AG.
1965

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät auf Antrag der Herren Proff. Dr. T. REICHSTEIN und Dr. H. ERLENMEYER.

Basel, den 1. März 1963

Prof. Dr. E. BAUMGARTNER
Dekan

Herrn ERNST ISELI wurde von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel am 1. März 1963 erlaubt, diese verkürzte Fassung seiner am 1. März 1963 genehmigten Inauguraldissertation drucken zu lassen. Die vollinhaltliche Arbeit mit dem Titel:

«*Die Inhaltsstoffe des Hautextraktes von* Bufo formosus BOULENGER»

kann eingesehen oder entliehen werden:

1. im Organisch-Chemischen Institut der Universität Basel;
2. in der Universitätsbibliothek Basel;
3. in der Schweizerischen Landesbibliothek in Bern.

Separatabdruck aus Helvetica Chimica Acta, Volumen 48,
Fasciculus quintus, 1965

Die Sterine und Bufadienolide der Haut von *Bufo formosus* BOULENGER

Über Krötengifte, 31. Mitteilung[2])

1. *Bisherige Literatur.* Die Giftstoffe der japanischen Erdkröte *Bufo formosus* BOULENGER (Nomenklatur vgl. GESSNER [2]) sind schon öfters untersucht worden. Über die Basen aus der Haut berichteten WIELAND & VOCKE [3] sowie OHNO *et al.* [4] (Struktur vgl. die Zusammenstellung bei FIESER & FIESER [5], p. 867–869). Von den Steroiden der Haut isolierten KOTAKE [6] und WIELAND & VOCKE [3] das krist. Gamabufotalin (**18**) sowie der erstere [7] krist. Bufotalin (**12**). Nach HÜTTEL & BEHRINGER [8] bestehen die Sterine der Haut zur Hauptsache aus Cholesterol und zu ca. 5% aus γ-Sitosterol. KOMATSU [9] isolierte krist. Bufalin (**6**). Papierchromatographisch haben BARBIER *et al.* [10] in der Haut neben Sterinen 9 Bufadienolide nachgewiesen, von denen 6 Laufstrecken zeigten, die mit denjenigen von Resibufogenin, Bufalin, Marinobufagin, Bufotalin, Arenobufagin und Gamabufotalin identisch waren. Aus den Ovarien konnten OHNO & OHMOTO [11] Palmitinsäure, γ-Sitosterol und Gamabufotalin isolieren, ausserdem durch Papierchromatographie Desacetylcinobufagin, Desacetylcinobufotalin, Cinobufotalin, Telocinobufagin und Hellebrigenin nachweisen.

[2]) 30. Mitt. vgl. E. ISELI *et al.* [1].

Die bisher genaueste Untersuchung der Hautsteroide haben OHNO, KOMATSU & OHMOTO [12] durchgeführt. Die Häute von 40000 Tieren lieferten die in Tab. 1 angegebenen Stoffe. Von diesen war Gamabufotalininol ein bisher unbekannter Stoff, dessen Analysen auf die Formel $C_{26}H_{36}O_6$ passten.

Tabelle 1. *Von* OHNO et al. [12] *isolierte Stoffe aus 40000 Tieren (in g)*[3])

2,625 g	γ-Sitosterol	0,219 g	Desacetylcinobufagin
12,47	Resibufogenin	0,327	Hellebrigenin
1,161	Cinobufagin	0,101	Desacetyl-cinobufotalin
0,941	Bufalin	19,964	Gamabufotalin
2,003	Cinobufotalin	0,238	Gamabufotalininol
0,738	Telocinobufagin		$C_{26}H_{36}O_6$

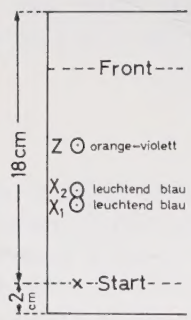


Fig. 1

Dünnschichtchromatogramm

SiO_2-G, Cy-Est-(3:7)[4]),
40 Min., $SbCl_3$

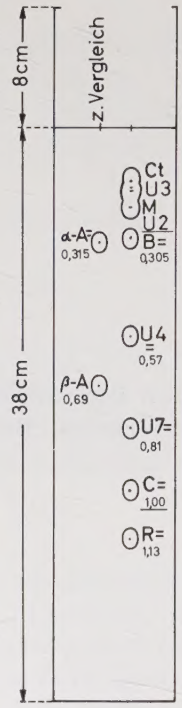


Fig. 2

Papierchromatogramme

Be-Cy-(1:1)/
Fmd, $7^1/_2$ Std.

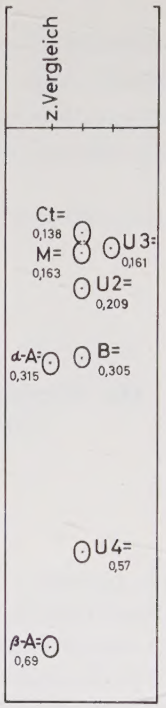


Fig. 3

Papierchromatogramme

Be-Cy-(1:1)/
Fmd, 15 Std.

Fig. 1 zeigt ein Dünnschichtchromatogramm [13] aufsteigend. Bei 110° getrocknet und heiss mit $SbCl_3$ (gesättigte Lösung in Chloroform) besprüht.

Im folgenden beschreiben wir die möglichst vollständige Analyse der Hautsteroide; sie war abgeschlossen bevor uns die Resultate von OHNO *et al.* [12] bekannt wurden.

[3]) In Chem. Abstr. [12] sind die Ausbeuten zum Teil falsch referiert. Herr Dr. OHNO teilte uns mit, dass es sich bei den angegebenen Mengen um Rohkristalle handelte. Von Gamabufotalin wurden ausserdem noch weitere Mengen durch direkte Kristallisation aus dem Extrakt erhalten.

[4]) Abkürzungen für Lösungsmittel etc. vgl. Einleitung zum Exper. Teil.

2. *Beschaffung des Ausgangsmaterials.* 500 Tiere wurden von dem einen von uns (M. K.) im März 1958 gefangen. Die Häute wurden mit Äthanol extrahiert (vgl. Exper. Teil). Die eingedampften Lösungen lieferten 209,1 g zähflüssigen Extrakt, der persönlich nach Basel überbracht wurde und dort im Januar 1959 in sehr gutem Zustand ankam.

3. *Kontrolle durch Dünnschicht- sowie Papierchromatographie.* Alle Trennungen wurden durch Dünnschichtchromatographie [13] unter Entwicklung mit $SbCl_3$ [14] sowie durch Papierchromatographie [15] [16] kontrolliert. Für die letztere dienten vorwiegend die in Fig. 2–6 angegebenen Systeme. Zur Erkennung der Flecke diente die Photokopie bei Belichtung mit monochromatischem Licht von ca. 300 nm [17]

Papierchromatogramme

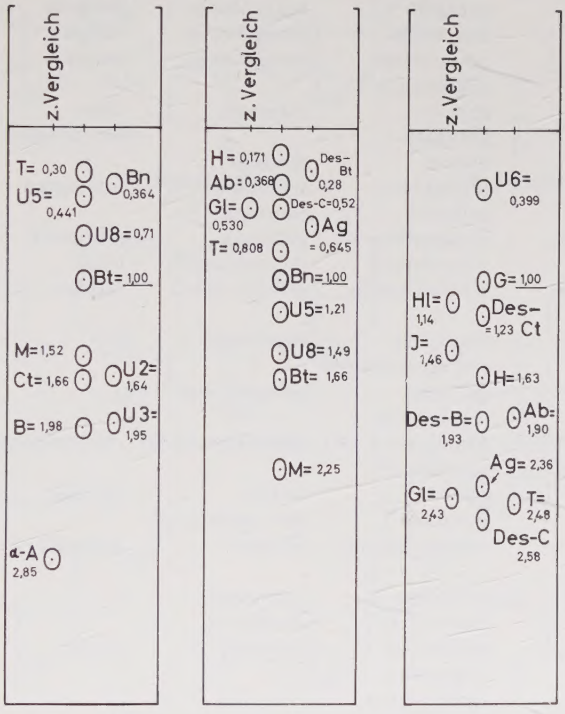


Fig. 4
Be/Fmd, 4 Std.

Fig. 5
Be-Chf-(7:5)/
Fmd, 2 Std.

Fig. 6
Chf/Fmd,
$2^1/_4$ Std.

Die Fig. 2–6 zeigen Papierchromatogramme [15] [16], Ausführung absteigend. Schematisiert aber massgetreu. Lokalisierung durch Photokopie [17] und anschliessende Färbung mit $SbCl_3$, vgl. Tabelle 2[4])[5]). Buchstabenbezeichnung der Stoffe vgl. Tabelle 2. Die zum Vergleich herangezogenen Stoffe sind: α-A = α-Artebufogenin [23], β-A = β-Artebufogenin [23], Gl = Gamabufotalininol [12], J = Jamaicobufagin [24], Hl = Hellebrigenol [25].

[5]) Das Papierchromatogramm wird zuerst mindestens 30 Min. bei 90° getrocknet (es soll frei von Imprägniermittel sein), dann durch eine gesättigte Lösung von $SbCl_3$ in $CHCl_3$ gezogen und anschliessend 3–5 Min. auf ca. 110° erhitzt.

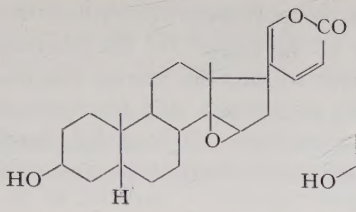
Tabelle 2. *Färbungen der Flecke mit $SbCl_3$* [14][5])

Substanz	Freies Genin		O-Acetylderivat	
	Tageslicht	UV.-Licht	Tageslicht	UV.-Licht
R = Resibufogenin	blassviolett	rotbraun (violett)[6])	graubraun	orangebraun
C = Cinobufagin	grüngelb	gelb	gelbgrün	gelbgrün
U4 = Bufalon	violett	violett		
U3 = Bufotalon	gelb → olivbraun	olivgelb		
B = Bufalin	schwach grünblaugrau	rotbraun	schwach blaugrau	schwach braun
U2 = 3-epi-Bufalin	farblos grüngelb[7])	farblos braunorange[7])	gelb → gelbgrün	gelbbraun
Ct = Cinobufotalin	violettblau	orangebraun	violett	goldbraun
M = Marinobufagin	braunviolett (gelbbraun)[6])	orangebraun	braun	braun
Bt = Bufotalin	gelb → graublau	rotbraun	blass braunviolett	braun
U5 = unbekannt	violett	olivgelb		
Bn = Bufotalinin	orange → gelbgrün	weissblau (weissgelb)[6])	braungrau	gelbbraun
T = Telocinobufagin	rotviolett → violettblau	grüngrau (grauviolett)[6])	rotviolett blau	rotbraun
Ag = Argentinogenin	farblos, gelb[7])	farblos, oliv[7])	farblos	blass braungelb
Des-C = Desacetyl-cinobufagin	rotviolett (grüngraublau)[6])	rosaviolett		
Des-Bt = Desacetyl-bufotalin	gelb → rotblaugrau (grünblau → graublau)[6])	orangebraun (violettbraun)[6])		
Ab = Arenobufagin	farblos grünblau[7])	farblos gelb, grüngrau[7])	farblos	farblos
H = Hellebrigenin = Bufotalidin	orange → grün	olivgelb	grüngelb	gelbgrün
Des-Ct = Desacetyl-cinobufotalin	rotviolett → blauviolett	leuchtend karminrot		
G = Gamabufotalin	rotblau → blaugrau (grünblau → blaugrau)[6])	braunrot	violett	ockerbraun
U6 = unbekannt	gelbgrün	leuchtend smaragdgrün		
U7 = unbekannt	farblos	hellblau		
U8 = unbekannt	farblos	hellblau		

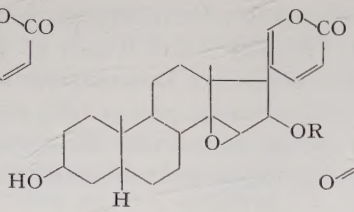
sowie zusätzliche Entwicklung mit $SbCl_3$ [14]. Die Farbe der Flecke im Tageslicht und UV.-Licht (vgl. Tab. 2) erlaubt eine weitere Differenzierung [18].

4. *Durchführung der Trennungen.* Da fraktioniertes Ausschütteln aus Wasser mit organischen Lösungsmitteln wegen starker Emulsionsbildung ungünstig war, wurde

[6]) Weniger häufig.
[7]) In hoher Konzentration.

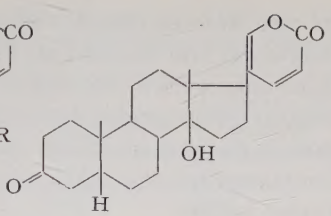


1 Resibufogenin (R)

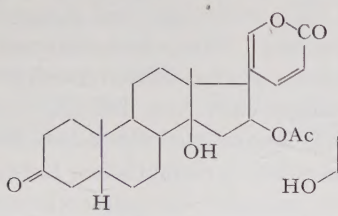


2 (R=H) Desacetylcinobufagin (Des-C)

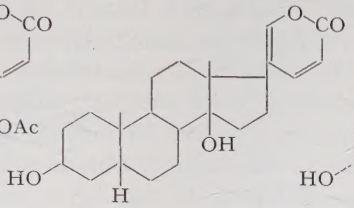
3 (R=Ac) Cinobufagin (C)



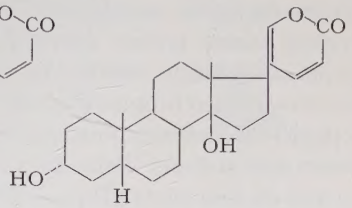
4 Bufalon (U4)



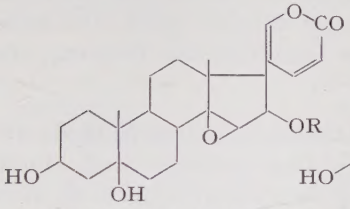
5 Bufotalon (U3)



6 Bufalin (B)

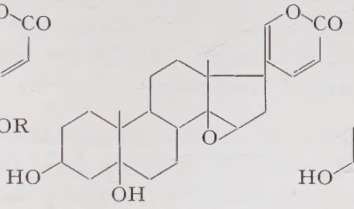


7 3-epi-Bufalin (U2)

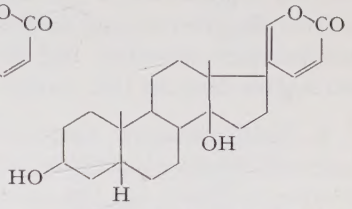


8 (R=H) Desacetylcinobufotalin (Des-Ct)

9 (R=Ac) Cinobufotalin (Ct)

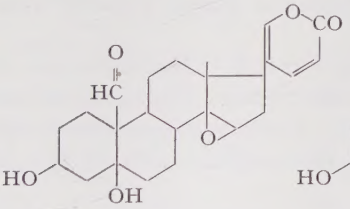


10 Marinobufagin (M)

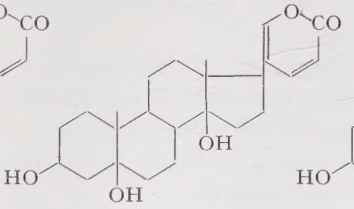


11 (R=H) Desacetylbufotalin (Des-Bt)

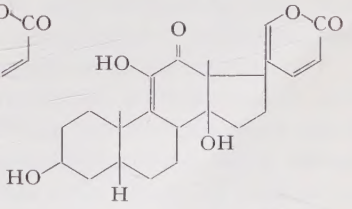
12 (R=Ac) Bufotalin (Bt)



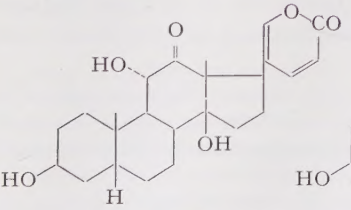
13 Bufotalinin (Bn)



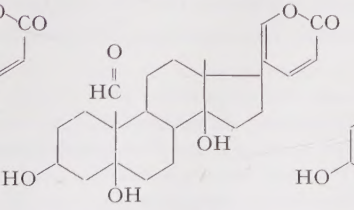
14 Telocinobufagin (T)



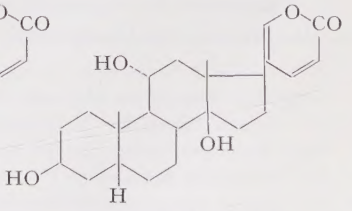
15 Argentinogenin (Ag)



16 Arenobufagin (Ab)



17 Hellebrigenin (H) = Bufotalidin



18 Gamabufotalin (G)

das rohe Material zunächst einer groben Verteilungschromatographie mit Petroläther, Chloroform und Butanol als Fliessmittel und Wasser an Kieselgur [16] als ruhender Phase unterworfen. Aus den so erhaltenen Konzentraten wurden die Sterine von den Geninen weitmöglichst durch Chromatographie an SiO_2 abgetrennt. Aus den Sterinen wurden die nur in kleiner Menge anwesenden Komponenten X1 und X2 durch Chromatographie an Al_2O_3 angereichert und schliesslich durch Verteilungschromatographie isoliert.

Bei den Bufogeninen wurde auf die Verwendung von Al_2O_3 weitmöglichst verzichtet, um Sekundärreaktionen [19] [20] auszuschliessen. Die besten Trennungen wurden erreicht durch Verteilungschromatographie an Cellulose-Formamid[8]) sowie durch Chromatographie an viel feinem SiO_2 nach Duncan [21], wobei das best geeignete System zuerst jeweils durch Papierchromatographie bzw. Dünnschichtchromatographie ausgesucht wurde. Die schliesslich verbliebenen Gemische wurden durch präparative Papierchromatographie im Schlitztrog [22] aufgetrennt. Von den insgesamt 22 papierchromatographisch nachgewiesenen Steroiden (3 Sterine und 19 Bufadienolide) liessen sich in dieser Weise die 3 Sterine und 16 Bufadienolide in einheitlichen Kristallen und die drei letzten Bufadienolide (R, U5 und Ag) in amorpher aber papierchromatographisch reiner Form fassen (vgl. Tab. 3). Schliesslich wurden noch kleine Mengen von drei Stoffen (U6, U7 und U8) in amorpher Form isoliert, die bei 300 nm nicht selektiv absorbierten und daher auf der Photokopie nicht sichtbar waren, also keine Bufadienolide darstellen. Mit $SbCl_3$ zeigte nur U6 bei Tageslicht eine Färbung; alle drei zeigten aber im UV. starke Fluoreszenz.

5. *Identifizierungen.* Ausser dem Sterin X1, dessen Identifizierung mit 7α-Hydroxycholesterol nicht ganz sicher ist, konnten alle in Kristallen isolierten Stoffe durch direkten Vergleich mit bekannten Steroiden eindeutig identifiziert werden. In allen Fällen wurde die Mischprobe gemacht und die Laufstrecke im Papierchromatogramm mit authentischem Material direkt verglichen. In vielen Fällen wurde die Identität durch Aufnahme der IR.- und NMR.-Spektren[9]) sowie durch Bereitung der O-Benzoyl- oder O-Acetylderivate weiter gesichert. In einzelnen Fällen konnten auch Massenspektren[10]) aufgenommen werden.

Von den drei amorphen Präparaten (R, U5 und Ag) wurde R = Resibufogenin als krist. O-Acetylderivat charakterisiert und als solches identifiziert. Das nur in kleiner Menge anwesende Ag war nach Papierchromatogramm, Farbreaktionen sowie Laufstrecke seines Di-O-acetylderivates identisch mit Argentinogenin. Das in Spuren vorhandene U5 wurde nicht identifiziert.

Die drei Nebenprodukte U6, U7 und U8 wurden ebenfalls nicht identifiziert.

6. *Diskussion der Resultate. – Sterine.* Die Sterine bestanden in unserem Material zur Hauptsache aus Cholesterol. Dies steht in Übereinstimmung mit den Resultaten

---

[8]) Ausgeführt analog der Methode von HEGEDÜS *et al.* (Kieselgur-Wasser) [16], vgl. Exper. Teil.

[9]) Wir danken Herrn Dr. R. ZÜRCHER, Physiklaboratorium der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, auch hier bestens für die Aufnahme von Protonenresonanzspektren. Sie waren besonders zur Erkennung des Ketons U3 sowie des 3-epi-Bufalins wertvoll.

[10]) Wir danken Herrn Dr. H. HÜRZELER, Physiklaboratorium der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel, auch hier bestens für die Aufnahme der Massenspektren von Bufalin und 3-O-Acetylbufalin.

Tabelle 3. *Physikalische Daten der isolierten Steroide und ihrer Derivate sowie die erhaltenen Ausbeuten aus 204,9 g Hautextrakt von 490 Kröten und Schätzung der wirklich vorhandenen Menge*[11])

Buchstabenbezeichnung und Name Lit. für Struktur	Formelnummer	Hier gefunden Smp. $[\alpha]_D$[12])	Werte der Literatur	Ausbeute an Kristallen in mg in %	Schätzung der wirklich vorhandenen Menge in mg in %
Z = Cholesterol		147–148° [−36,9]	147–148° [−36,4] [8]	[13])	20000 9,75%
X1 = 7α-Hydroxycholesterol[14]) [26][15])		208–216°	186–187° [−89] [27]	1,5 0,0007%	20 0,01%
X2 = 7β-Hydroxycholesterol [26][16])		165–167° [+5,5]	174–176° [27] [+4] [28]	8,5 0,004%	40 0,019%
R = Resibufogenin [19]	**1**	nicht kristallisiert	113–140/ 155–168° [29] 120–130/ 200–218° [24] [−7,1] [29]	[17])	120 0,059%
Ac-R = O-Acetylresibufogenin		167/211–228° [−0,7]	218–230° [−1,1] [30]	74 0,036%	
C = Cinobufagin [31]	**3**	167–170/ 210–213° [−3,2]	216–217° [32] [−3,6]	40 0,019%	80 0,039%
Ac-C = O-Acetylcinobufagin		197–201° [−0,6]	204–205° [−1,6] [32]		
U4 = Bufalon [33]	**4**	219–234° [+2,9]	241–243° [−3,0] [32]	8,5 0,004%	40 0,019%
U3 = Bufotalon [34]	**5**	263–274° [+5,7]	272–277° [+9,1] [32]	12 0,006%	65 0,031%
B = Bufalin [33]	**6**	232–241° [−9,4]	244–248° [−8,7] [32]	353 0,172%	550 0,268%
Ac-B = O-Acetylbufalin		231–244° [−5,6]	230–248° [−8,7] [32]		
U2 = 3-epi-Bufalin [35]	**7**	259–269° [−1,5] [−12,4 Me]	268–273° [−12,0 Me] [35]	32 0,016%	80 0,039%
Ac-U2 = O-Acetyl-3-epi-bufalin		230–235°	228–235° [+21,0] [36]		
Ct = Cinobufotalin [37]	**9**	251–255° [+9,8]	259–262° [+10,7] [32]	54 0,026%	130 0,063%
Ac-Ct = O-Acetylcinobufotalin		204–216° [+20,5]	212–214° [+23,8] [32]		
M = Marinobufagin [38]	**10**	215–217° [+8,6]	224–225° [+10,0] [39]	45 0,022%	185 0,090%

[11]) Rohe Schätzung auf Grund der erhaltenen Ausbeuten und der Stärke der Flecke im Papierchromatogramm.
[12]) In Chloroform, sofern nichts anderes angegeben.
[13]) Es wurde nur ein kleiner Teil gereinigt.
[14]) Nicht eindeutig identifiziert.
[15]) In der früheren Lit. irrtümlich als 7β-Hydroxycholesterol bezeichnet.
[16]) In der früheren Lit. irrtümlich als 7α-Hydroxycholesterol bezeichnet.
[17]) Nur als O-Acetylderivat kristallisiert.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Buchstabenbezeichnung und Name Lit. für Struktur	Formelnummer	Hier gefunden Smp. $[\alpha]_D$[12])	Werte der Literatur	Ausbeute an Kristallen in mg in %	Schätzung der wirklich vorhandenen Menge in mg in %
Ac-M = O-Acetyl-marinobufagin		191–221° [+28,9]	194–220° [+25,7] [39]		
Bt = Bufotalin [34]	**12**	156–158/ 227–231° [+5,0]	148/220° [40] 218–225° [18c] [+5,4] [40]	1357 0,662%	1960 0,955%
Ac-Bt = O-Acetyl-bufotalin		247–260° [+5,5]	263–269° [+3,7] [32]		
U5 = unbekannt		amorph[18])		7 0,003%	15 0,007%
Bn = Bufotalinin [41][19])	**13**	105/213–233° [+19,2]	195–201° [18c] 200–220° [20] [+19,2] [18c]	13 0,006%	50 0,024%
Ac-Bn = O-Acetyl-bufotalinin			235–243° [+30,6] [18c]		
T = Telocino-bufagin [42]	**14**	157–159/ 205–206° [+5,9]	160–175/ 210–211° [32] [−4,4] [32]	42 0,020%	105 0,050%
Ac-T = O-Acetyl-telocinobufagin		255–270° [+22,9]	270–278° [+22,9] [32]		
Ag = Argentino-genin [20]	**15**	amorph[18])	227–230° [−20,6] [20]	14 0,007%	30 0,014%
Ac-Ag = O-Acetyl-argentinogenin		amorph[18])	amorph[18]) [20]		
Des-C = Desacetyl-cinobufagin [31]	**2**	179–181° [+19,5]	180–182° [+22,0] [43]	18 0,009%	45 0,022%
Ac-Des-C = O-Acetyl-cinobufagin		199–202° [−1,4]	204–205° [−1,6] [32]		
Des-Bt = Desacetyl-bufotalin [18b]	**11**	160–165/ 218–235° [+40,0]	210–223° [18b] [+30,0 Dioxan]	76 0,037%	255 0,124%
Ac-Des-Bt = O-Acetylbufotalin		249–264° [+5,3]	263–269° [+3,7] [32]		
Ab = Areno-bufagin [44]	**16**	225–232° [+67,5]	231–233° [45] [+69,2] [20] [+53 Me] [29]	143 0,070%	330 0,161%
Ac-Ab = Di-O-acetyl-arenobufagin		228–249° [+43,5]	246–248° [46] [+40,4] [20]		
H = Hellebrigenin = Bufotalidin [25a]	**17**	153–157/ 232–235° [+19,5]	150/237° [25a] 239–249° [18b] [+17,2] [18b] [+18 An] [25a]	25 0,012%	60 0,029%
Ac-H = O-Acetyl-hellebrigenin		220–247° [+34,3]	242–247° [25a] [+33,7]		
Des-Ct = Desacetyl-cinobufotalin [37]	**8**	160/245–251° [+32 Me]	251–261° [+33,6 Me] [18b]	18 0,009%	55 0,026%

[18]) Nach Papierchromatogramm einheitlich.
[19]) Formel nicht sicher bewiesen.

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Buchstabenbezeichnung und Name Lit. für Struktur	Formelnummer	Hier gefunden Smp. $[\alpha]_D$[12])	Werte der Literatur	Ausbeute an Kristallen in mg in %	Schätzung der wirklich vorhandenen Menge in mg in %
Ac-Des-Ct = O-Acetyl-cinobufotalin			212–214° [+23,8] [32]		
G = Gamabufotalin [47]	**18**	260–269° [−13,7 Me]	261–263° [6] [+1,3 Me][20]) [18b]	2136 1,04%	2400 1,17%
Ac-G = Di-O-acetyl-gamabufotalin		253–264° [−8,0]	265–266° [32] [−10,4] [32]		
U6[21]) unbekannt		amorph		12 0,006%	80 0,039%
U7[21]) unbekannt		amorph		5 0,002%	10 0,005%
U8[21]) unbekannt		amorph		8 0,004%	20 0,010%

von Hüttel & Behringer [8]. Ob daneben noch etwas γ-Sitosterol (oder andere schwach polare Sterine) anwesend waren, haben wir nicht geprüft[22]).

Neben Cholesterin waren zwei stärker polare Sterine vorhanden, die sich durch die blaue Färbung mit $SbCl_3$ leicht feststellen lassen. Von diesen war X2 identisch mit 7β-Hydroxycholesterol[23]). Von X1 wurden nur 1,5 mg in Kristallen erhalten; nach der Laufstrecke im Papierchromatogramm sowie nach den Farbreaktionen lag wahrscheinlich 7α-Hydroxycholesterol vor, obwohl der Smp. erheblich höher lag als die Literaturwerte (Tab. 3). Es ist bekannt, dass 7α- und 7β-Hydroxycholesterol bei der Autoxydation von Cholesterol entstehen ([5], p. 257).

Bufadienolide. In Übereinstimmung mit früheren Befunden [6] [7] [3] ist Gamabufotalin **18** mit über 1% das Hauptbufogenin des Extraktes, gefolgt von Bufotalin **12** mit schätzungsweise 0,95% und Bufalin **6** mit ca. 0,26%. Ausser Gamabufotalininol[24]), das wir aus unserem Extrakt nicht isolieren konnten und das darin nach papierchromatographischer Kontrolle (vgl. Fig. 5 und 6) vermutlich nicht anwesend war, haben wir alle von Ohno *et al.* [12] isolierten Stoffe (Tab. 1) ebenfalls erhalten. Ausserdem isolierten wir 8 weitere krist. Bufadienolide, Bufalon **4** (U4), Bufotalon **5** (U3), 3-epi-Bufalin **7** (U2), Marinobufagin **10** (M), Bufotalin **12** (Bt), Bufotalinin **13** (Bn), Desacetylbufotalin **11** (Des-Bt) und Arenobufagin **16** (Ab) in teilweise erheblichen Mengen sowie zwei weitere, einen unbekannten Stoff U5 und Argentinogenin **15** (Ag),

[20]) Dieses Präparat hatte ca. 20% Arenobufagin enthalten, das leicht überschen wird, weil es mit $SbCl_3$ keine Färbung gibt.

[21]) Zeigte bei 300 nm keine Absorption, daher kein Bufadienolid.

[22]) Eine Abtrennung sollte über das Dibromid möglich sein, vgl. Bergmann [48].

[23]) Wir danken Herrn Prof. S. Bergström, Karolinska Inst., Stockholm, für reine Proben von 7α- und 7β-Hydroxycholesterol und Herrn Dr. F. Hunziker, Dr. Wander AG, Bern, für eine Probe von Di-O-acetyl-7β-hydroxy-cholesterol.

[24]) Wir danken Herrn Prof. K. Meyer sowie Herrn Dr. S. Ohno auch hier bestens für die Überlassung einer Probe des Originalpräparates.

in amorpher Form. Die meisten dieser Stoffe sind aus anderen Krötenarten bereits früher isoliert worden. Noch nie wurde die Isolierung von Bufalon **4** (U4), Bufotalon **5** (U3) sowie 3-epi-Bufalin **7** (U2) aus solchem Material beschrieben; alle drei waren aber durch Teilsynthese bereits früher bereitet worden. Bufalon (U4) kommt vermutlich auch im Sekret von *Bufo marinus* vor, denn die früher [24] daraus in amorpher Form isolierte Substanz L ist nach Papierchromatogramm und Farbreaktion mit $SbCl_3$ identisch mit Bufalon (U4).

Zur Beschaffung des Hautextraktes standen uns Mittel aus den Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes (Bundesamt für Industrie, Gewerbe und Arbeit in Bern) zur Verfügung. Einen Beitrag an die weiteren Kosten dieser Arbeit erhielten wir vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung. Es sei auch hier bestens für diese Hilfe gedankt.

Experimenteller Teil

Alle Smp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert. Fehlergrenze in benützter Ausführungsform bis 200° ca. ± 2°, darüber ca. ± 3°. Übliche Aufarbeitung bedeutet: Eindampfen im Vakuum, Aufnehmen in Chf-Ae-(1:3), Waschen mit 2N HCl, 2N Na_2CO_3 und Wasser, Trocknen über Na_2SO_4 und Eindampfen im Vakuum. Substanzproben zur Drehung und für Absorptionsspektren wurden 1 Std. bei 70° und 0,01 Torr getrocknet. Für die Adsorptionschromatographien nach der Durchlaufmethode [49] diente Al_2O_3 («Woelm» neutral, eingestellt auf die jeweilige Aktivitätsstufe nach Angabe des Herstellers) sowie SiO_2 («Dr. Bender & Dr. Hobein AG», Zürich, engporig 0,15–0,3 mm, oder «Merck» 0,05–0,2 mm Korngrösse). Verteilungschromatographien an gereinigtem Kieselgur [16] (Hyflo-Super Cel) oder an gereinigter Cellulose [50] (Typ HR-L 600, Mikrotechnik GmbH, Miltenberg a. M.); Dünnschichtchromatographie und Papierchromatographie vgl. Fig. 1–6.

Es wurden folgende Abkürzungen benützt: Ac = CH_3CO–, Ac_2O = Acetanhydrid, AcOH = Eisessig, Ae = Diäthyläther, Alk = Äthanol, An = Aceton, Be = Benzol, Bu = n-Butanol, Chf = Chloroform, Cy = Cyclohexan, Des = Desacetyl, Dchr = Dünnschichtchromatogramm und Dünnschichtchromatographie, Est = Äthylacetat, Fmd = Formamid, Fr = Fraktion(en), Me = Methanol, ML = eingedampfte Mutterlauge, n.w.u. = nicht weiter untersucht, Pe = Petroläther, Pchr = Papierchromatogramm und Papierchromatographie, Pgl = 1,2-Propylenglykol, iPr = Isopropanol, Py = Pyridin, W = Wasser.

1. *Ausführung der Acetylierungen:* 1 Gewichtsteil Substanz wurde mit 10 Volumenteilen abs. Py und 8 Volumenteilen Ac_2O 16 Std. bei 37° stehengelassen; dann erfolgte übliche Aufarbeitung (siehe oben).

2. *Beschaffung des Ausgangsmaterials.* 500 japanische Kröten, *Bufo formosus* Boulenger, wurden im März 1958 in der Saitama Präfektur, ca. 70 km nordwestlich von Tokio, Japan, gefangen und enthäutet. Die Häute wurden sofort in Alk eingelegt und so nach Osaka transportiert. Dort wurde die abfiltrierte alkoholische Lösung bei ca. 20 Torr eingedampft. Die Häute wurden noch dreimal je 2 Wochen in Alk eingelegt und die jeweiligen Filtrate bei Normaldruck eingedampft. Die vereinigten Eindampfrückstände ergaben 209,1 g dunkelbraunes, zähflüssiges, inhomogenes Material. Es kam im Januar 1959 in sehr gutem Zustand in Basel an, wo es bis zur Verarbeitung bei 0° aufbewahrt wurde.

3. *Vortrennung durch grobe Verteilungschromatographie an Kieselgur-Wasser als ruhende Phase.* 1 kg gereinigtes Kieselgur [16] (Hyflo Super Cel) wurde mit 1 kg W gut vermischt, gesiebt und mit Pe in Chromatographierohr Nr. 4 [16] eingestopft. 204,9 g Krötenextrakt (entspr. ca. 490 Tieren) wurden mit 320 ml W und 40 ml Me verflüssigt, mit 200 g gereinigtem Kieselgur innig vermischt, im Vakuum von Me befreit, auf die Säule aufgetragen und mit organischen Lösungsmitteln steigender Polarität eluiert. Pro Tag wurden 2–4 Fr. zu ca. 1000 ml entnommen, vgl. Tab. 4.

Die Fr. A 28 und A 29 enthielten (ausser Spuren G) nur Stoffe, die im System von Fig. 6 keine merkliche Wanderung zeigten (vermutlich auch Basen und Bufotoxine); sie wurden nicht weiter untersucht. Das leichter eluierbare Material wurde zur Vortrennung der Sterine sowie zur Trennung der Sterine und Bufadienolide in den 6 angegebenen Gruppen durch Chromatographie an SiO_2 weiter vorgetrennt, vgl. Tab. 5.

Tabelle 4. *Grobe Verteilungschromatographie von 204,9 g Extrakt*

Fraktions-Nr.	Eluiermittel	Eindampfrückstand		Weitere Verarbeitung
		Menge in g	Flecke im Pchr[25])	
A 1–3	Pe	59,75	Sterine	Chromat. M
A 4	Pe	10,4	Sterine, R, C	Chromat. B
A 5	Chf	4,23	Sterine, C, B, M, Bt	Chromat. C
A 6	Chf	11,94	Sterine, C, B, M, Bt, Bn	Chromat. D
A 7	Chf	10,33	Sterine, C, B, M, Bt, Bn, T, Ab, H, G	Chromat. E
A 8–14	Chf	13,03	Sterine, B, M, Bt, (Bn), T, Ab, H, Des-Ct, G	Chromat. F
A 15–27	Chf-Bu (9:1) bis Bu	9,74	Ab, G	Chromat. U
A 28	Bu	4,76	(G), Rest stationär	n.w.u.
A 29	Me (9 Liter)	48,0	stationär	n.w.u.

4. *Isolierung der Sterine.* Von Cholesterin wurde nur eine Probe durch Kristallisation von Fr. B 2–20 gewonnen (siehe dort). Zur Isolierung von X1 und X2 wurden die Fr., die diese reichlich enthielten, jedoch keine (oder fast keine) Bufadienolide, in 6 Portionen an Al_2O_3 (Akt. II) weiter angereichert, vgl. Tab. 6.

Chromatographie R. Die 273 mg Fr. Q 5–13 wurden einer Verteilungschromatographie unterworfen. Die Säule wurde mit 150 g gereinigtem Kieselgur, das mit 15 g Pgl (frisch bei 12 Torr destilliert) homogen vermischt und gesiebt worden war, in Pentan suspendiert eingefüllt. Zum Eluieren diente reines Pentan. Pro Std. wurden 2 Fr. zu 15–25 ml genommen.

Die Fr. 1–109 (290 mg) enthielten Z und eine Spur X1 (n.w.u.). Die Fr. 110–133 (10 mg) zeigten auf der Platte (Fig. 1) nur den X1-Fleck und gaben aus Ae-Pe 1,5 mg krist. X1. Die Fr. 134–191 (44 mg) zeigten die Flecke X1 und X2; sie wurden nicht weiter getrennt. Die Fr. 192–235 (31 mg) zeigten nur den X2-Fleck und gaben aus Ae-Pn 8,5 mg krist. X2. Die Fr. 236–265 gaben total nur noch 2 mg Rückstand, der kein X2 mehr enthielt.

5. *Trennung der Bufogenine.* Die von den Sterinen weitgehend befreiten Bufogenine wurden erneut in Gruppen zusammengefasst und teilweise durch Verteilungschromatographie an Cellulose-Fmd (Chromatogr. U, V und W), teilweise an feinem SiO_2 nach Duncan [21] (Chromatogr. Y, Z, AA-AH) weiter chromatographiert. Dabei konnten Gamabufotalin (G), Bufotalin (Bt), Cinobufotalin (Ct), Bufalin (B), 3-epi-Bufalin (U2), Marinobufagin (M), Telocinobufagin (T), Arenobufagin (Ab) und Desacetyl-bufotalin (Des-Bt) in Kristallen isoliert werden.

Verteilungssäule. 1,8 kg Cellulose wurden mit 0,05 N LiOH und W gewaschen, im Vakuum vollständig getrocknet, mit 800 g reinem Fmd und soviel An versetzt, dass ein dicker Brei entstand. Dieser wurde auf der Maschine 1 Std. geschüttelt, dann im Vakuum vom An befreit. Das gesiebte Pulver wurde in Be aufgeschlämmt und in eine Säule Nr. 4 [16] eingefüllt. Laufgeschwindigkeit beim Eluieren ca. 40–50 Tropfen pro Min., entsprechend 3–4 Fr. à 450 ml pro Tag. Jede Fr. wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Chf aufgenommen und zur Entfernung des Fmd mit W gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingedampft. Dieselbe Säule diente für alle drei Chromatographien (vgl. Tab. 7).

Für die folgenden 7 Chromatographien nach Duncan [21] wurde Säule Nr. 2 [16] verwendet. Bei Y, Z und AA immer dieselbe Säule mit 700 g Silicagel «Merck», pro Std. 2 Fr. à 25 ml. Bei AC wurden 600 g regeneriertes Kieselgel «Merck» benützt nach Waschen mit Chf-Me und 4-stündigem Trocknen bei 90–120°, pro Std. 2 Fr. à 35 ml. Für AF, AG und AH dienten 350 g Kieselgel «Merck», pro Std. 2 Fr. à 20–25 ml (vgl. Tab. 8).

Die in den bisherigen Chromatographien nicht in reiner Form isolierten Genine waren jetzt so weit angereichert, dass sie durch präparative Papierchromatographie isoliert werden konnten. Es wurden so R, C, U3, U4, Des-Ct, Ab, H, Des-Bt, U5, Bn, Ag und Des-C isoliert, ebenso die Substanzen U6, U7 und U8. Vgl. Tab. 9.

[25]) In Klammern schwache Flecke.

Tabelle 5. *Chromatographien der Fr. A 1–14 an SiO_2*

Chromat. Nr.	Eingesetzte Substanz in g	Fraktions-Nr.	Eluiermittel	Eindampfrückstand			Weitere Verarbeitung
				Menge in mg	Flecke im Pchr[25])	Kristalle in mg	
M	A 1–3		je 1500 ml				
	58,35	1–4	Pe-Be-(1:1) bis -(1:4)	42383	Y[26]), Z		n.w.u.
	SiO_2 600	5–9	Pe-Be-(1:4), Be, Be-Chf-(35:65)	8114	Z, X1, X2		Chromat. N
		10–12	Chf, Chf-Me-(9:1) bis -(1:1)	6070	Z, X1, X2		Chromat. O
B	A 4		je 700 ml				
	10,4	1	Pe-Be-(1:1)	3295	Y[26])		n.w.u.
	SiO_2 200	2–20	Pe-Be-(1:1), Be, Be-Chf bis Chf	4164	Z, X1, X2	226 Z	ML zu Chromat. K
		21–22	Chf-Me-(9:1) bis -(1:1)	1567	Z, X1, X2, C		Chromat. O
C	A 5		je 400 ml				
	4,12	1	Pe	1567	Y[26])		n.w.u.
	SiO_2	2–10	Pe bis Pe-Be-(1:4)	1439	Z, (X)		Chromat. J
		11–18	Pe-Be-(1:4), Be, Be-Chf bis Chf	130	Z, X		Chromat. K
		19–20	Chf-Me-(9:1) bis -(1:1)	1256	(Z), X, C, B, M, Bt		Chromat. O
D	A 6		je 900 ml				
	9,1	1–2	Pe-Be-(1:1)	2899	Y[26])		n.w.u.
	SiO_2	3–13	Pe-Be-(1:4), Be,				
	300		bis Be-Chf-(1:4)	684	Z, (C)		Chromat. K
		14–17	Chf	702	Z, X1, X2		Chromat. O
		18–32	Chf	462	C, B, M, Bt, Bn		Chromat. V
		33–45	Chf-Me-(98:2) bis -(1:1)	2919	M, Bt, Bn, T, Ab, H, G		Chromat. W
E	A 7		je 1000 ml				
	10,33	1–3	Pe-Be-(1:1)	711	Y[26])		n.w.u.
	SiO_2	4–8	Pe-Be-(1:4), Be	217	Z, X		Chromat. K
	325	9–12	Be-Chf bis -(1:1)	56	Z, X, C, (M)		Chromat. O
		13–28	Chf, Chf-Me-(98:2)	5452	C, B, M, Bt, U5, Bn, T, Ag, Ab, H, G		Chromat. V
		29–34	Chf-Me bis (1:1)	4455	T, Ab, H, Des-Ct, G		Chromat. W
F	A 8–14		je 1300 ml				
	13,026	1	Pe-Be-(1:1)	2553	Y[26])		n.w.u.
	SiO_2	2–8	Pe-Be-(1:4), Be,				
	390		bis Be-Chf-(1:4)	235	Z		Chromat. K
		9–13	Chf	1765	C, B, M, Bt, Bn, T, Ag		Chromat. V
		14–25	Chf-Me-(99:1) bis -(1:1)	4284	Bt, T, Ag, Ab, Des-Bt, H, G	15 G	Ml zu Chromat. W

[26]) Als Y wurde ein Fleck bezeichnet, der im Pchr etwas langsamer lief als Z, aber von der Säule immer zuerst eluiert wurde. Der Fleck war schon ohne $SbCl_3$-Behandlung braun. Eine Isolierung von reinem Y gelang nicht.

Tabelle 6. *Anreicherung von X1 und X2 an Al_2O_3*

Chromat. Nr.	Eingesetzte Substanz in g	Fraktions-Nr.	Eluiermittel	Eindampfrückstand		Weitere Verarbeitung
				Menge in mg	Flecke im Pchr[25])	
N	M 5–9		je 800 ml			
	8,114	1–10	Be bis Be-Chf-(2:3)	5977	Z	n.w.u.
	Al_2O_3					
	250	11–13	Chf bis Chf-Me-(98:2)	166	Z, X1, X2	Chromat. Q
		14–15	Chf-Me-(1:1)	72	(Z), (R), (C)	Chromat. V
J	C 2–10		je 140 ml			
	1,439	1–18	Pe-Be, Be bis	880	Z	n.w.u.
	Al_2O_3		Be-Chf-(2:3)			
	43	19–22	Chf	79	Z, X1, X2	Chromat. Q
		23–31	Chf-Me bis (1:1)	157	(C), (M)	Chromat. V
K	B 2–20		je 500 ml			
	C 11–18	1–10	Be bis Chf	2418	Z (Probe krist.)	n.w.u.
	D 3–13	11–13	Chf. u.	255	Z, X1, X2	Chromat. Q
	E 4–8		Chf-Me-(95:5)			
	F 2–8	14–18	Chf-Me bis (1:1)	1754	(C), (M)	Chromat. V
	4,785					
	Al_2O_3					
	145					
O	M 10–20		je 800 ml			
	E 9–12	1–3	Be-Chf bis -(2:8)	777	Z	n.w.u.
	D 14–17	4	Chf	956	Z, X1, X2	Chromat. P
	C 19–20	5–17	Chf bis	2131	schnelle Genine	Chromat. W
	B 21–22		Chf-Me-(1:1)			
	9,651	18–19	Chf-Me-(1:1)+	1446	schnelle Genine	Chromat. W
	Al_2O_3		5% AcOH			
	250					
P	O 4		je 100 ml			
	0,956	1–3	Be-Chf-(2:8)	655	Z	n.w.u.
	Al_2O_3	4–5	Chf	207	Z, X1, X2, R	Chromat. Q
	30	6–8	Chf, Chf-Me-(98:2)	58	(R), (C), (M), Bt	Chromat. W
Q	J 19–22		je 60 ml			
	K 11–13	1–4	Be-Chf bis -(3:7)	187	Z	n.w.u.
	N 11–13	5–13	Be-Chf-(3:7)			
	P 4–5		Chf, Chf-Me-(9:1)	273	Z, X1, X2	Chromat. R
	0,632					
	Al_2O_3					
	20					

Ausführung im Schlitztrog [22]. Papier WHATMAN 1, Blattgrösse 19×46 cm. Imprägnieren mit Fmd durch einfaches Durchziehen durch eine Lösung von An-Fmd-(4:1). Lokalisierung der Zonen durch Photokopie [17]. Die ausgeschnittenen Zonen wurden zerkleinert, dreimal mit Me ausgezogen und die Papierschnitzel jeweils unter hohem Druck ausgepresst. Das Eluat wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Chf aufgenommen, mit W gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, im Vakuum eingedampft und durch Filtration durch etwas Al_2O_3 (Akt. 4) gereinigt.

Tabelle 7. *Verteilungschromatographien der Bufadienolide*

Chromat. Nr.	Eingesetzte Substanz in g	Fraktions-Nr.	Eluiermittel	Eindampfrückstand			Weitere Verarbeitung
				Menge in mg	Flecke im Pchr[25])	Kristalle in mg	
U	A 15–27	1–3	Chf	–			
	9,74	4	Chf	159			Chromat. AA
		5–6	Chf	230	Ab		präp. Pchr AK
		7–32	Chf, Chf-Me-(95:5)	992	G	570 G	ML zu Chromat. AH
		33–38	Chf-Me-(95:5)	379	G, U6		Chromat. AH
		39–68	Chf-Me-(1:1), Me	?	fast nur stationär		n.w.u.
V	D 18–32	1–5	Be	–			
	E 13–28	6–7	Be	2006	R, C		Chromat. AA
	F 9–13	8–13	Be	996	C, B		Chromat. Z
	J 23–30	14–20	Be	1130	B, U2, Ct, M		Chromat. Y
	K 14–18	21–22	Be	128	B, Ct, M, Bt		n.w.u.
	N 14–15	23–30	Be	1702	(M), Bt	1035 Bt	
	Q 14	31–56	Be	465	Bt, U5, Bn		Chromat. AC
	9,705	57–75	Be-Chf-(9:1)	306	Bn, T, Ag		Chromat. AF
		76–90	Be-Chf-(1:1) und Chf	867	T, Ag, Des-C, Ab, Des-Bt, H, G		Chromat. AG
		91–99	Chf	145	H, G		Chromat. AH
W	D 33–45	1–3	Be	–			
	E 29–34	4–7	Be	2455	R, C		Chromat. AA
	F 14–25	8–12	Be	314	C, B, M		Chromat. Z
	O 5–18	13–14	Be	91	Bt	59 Bt	
	P 6–8	15–38	Be, Be-Chf-(9:1)	459	Bt		Chromat. AC
	15,20	39–48	Be-Chf-(1:1)	264	Bt, Bn, T, Des-Bt		Chromat. AF
		49–52	Chf	1274	T, Ag, Ab, H		Chromat. AG
		53–56	Chf	2281	G	1358 G	ML Chromat. AH
		57–63	Chf	168	G		Chromat. AH

6. *Beschreibung und Identifizierung der isolierten Stoffe.* Drehungen wo nichts anderes erwähnt in Chf.

a) *Sterine.* – *Cholesterol* (Z). Aus Chf-Me farblose flache Nadeln, Smp. 147–148°, $[\alpha]_D^{23} = -36{,}9° \pm 2°$ ($c = 1{,}10$). Nach Dchr, Farbreaktion mit $SbCl_3$ und Mischprobe identisch mit authentischem Material.

3-O-Benzoylcholesterol. 80 mg Cholesterol aus *Bufo formosus* vom Smp. 147–148° wurden in 1,6 ml abs. Py gelöst, bei 0° mit 0,56 ml Benzoylchlorid versetzt und 20 Std. bei 20° stehengelassen. Dann wurde mit 1 ml Me versetzt und noch 3 Std. stehengelassen. Nach üblicher Aufarbeitung wurde das neutrale Rohprodukt an 9 g Al_2O_3 (Akt. II) chromatographiert und aus An-Ae kristallisiert. Farblose Plättchen mit dem bekannten Doppel-Smp. flüssiger Kristalle 147–151°/168°, $[\alpha]_D^{23} = -17{,}5° \pm 4°$ ($c = 0{,}55$). Nach Mischprobe und IR.-Spektrum identisch mit authentischem Material.

7α-Hydroxycholesterol (*X1*). Es wurden nur 1,5 mg leicht braun gefärbte Kristalle erhalten. Smp. 208–216°. Laufstrecke im Pchr und Dchr sowie Färbung mit $SbCl_3$ gleich wie bei authentischem Material. Die Identität ist nicht völlig gesichert.

7β-Hydroxycholesterol (*X2*). Aus Ae-Pe farblose körnige Kristalle, Smp. 165–167°, $[\alpha]_D^{25} = +5{,}5° \pm 3°$ ($c = 0{,}72$). Nach Dchr, Färbung mit $SbCl_3$, Mischprobe und IR.-Spektrum (fest in KBr) identisch mit authentischem Material.

Tabelle 8. *Trennung der Bufadienolide nach* DUNCAN *an feinem Kieselgel* «MERCK»

Chromat. Nr.	Eingesetzte Substanz in g	Fraktions-Nr.	Eluiermittel	Eindampfrückstand Menge in mg	Flecke im Pchr[25])	Kristalle in mg	Weitere Verarbeitung
Y	V 14–20	1–3	Chf-Bu-(85:15)	–			
	1,13	4–14	Chf-Bu-(85:15)	90	U4, U3		präp. Pchr. AE
	SiO_2	15	Chf-Bu-(85:15)	11	B, Ct, M		n.w.u.
	700	16–18	Chf-Bu-(85:15)	111	Ct	54 Ct	
		19–20	Chf-Bu-(85:15)	121	B, Ct	11 B	
		21–22	Chf-Bu-(85:15)	179	B	270 B[27])	
		23	Chf-Bu-(85:15)	65	B, U2, M		n.w.u.
		24–29	Chf-Bu-(85:15)	228	U2, M	32 U2	ML zu Y 30–31
		30–31	Chf-Bu-(85:15)	13	U2, M	45 M[28])	
		32–112	Chf-Bu-(85:15)	41	(Bt), (T)		n.w.u.
		113–183	Chf-Bu-(85:15)	34	T		Chromat. AF
Z	V 8–13	1–7	Chf-Bu-(85:15)	–			
	W 8–12	8–16	Chf-Bu-(85:15)	98	U4, U3		präp. Pchr. AE
	1,31	17–23	Chf-Bu-(85:15)	47	(R), (C), (U3), (B)		n.w.u.
	SiO_2	24–27	Chf-Bu-(85:15)	306	B		siehe Y 21–22
	700	28–32	Chf-Bu-(85:15)	196	B	72 B	
		33–70	Chf-Bu-(85:15)	92	(M)		n.w.u.
AA	U 4	1–16	Chf-Bu-(85:15)	492	Y, (C)		n.w.u.
	V 6–7	17–29	Chf-Bu-(85:15)	505	R, C, U7		präp. Pchr. AD
	W 4–7	30–129	Chf-Me-(3:1)	2790	(R), (C), u. stationär		n.w.u.
	4,62						
AC	V 31–56	1–10	Est	–			
	W 15–38	11–24	Est	77	(Bt), T		Chromat. AF
	0,924	25–34	Est	335	Bt, (T)	263 Bt	
	SiO_2	35–104	Est	65	(Bt), (U5), (T)		Chromat. AF
	600	105–262	Est	39	(Ab), (H)		Chromat. AG
		263–305	Chf-Me-(1:1)	101	–		n.w.u.
AF	V 57–75	1–6	Chf-iPr-(85:15)	–			
	W 39–48	7–8	Chf-iPr-(85:15)	49	(Bt)		n.w.u.
	Y 113–183	9–13	Chf-iPr-(85:15)	90	Bt, U8, U5, Bn		präp. Pchr. AR
	AC 11–24	14–22	Chf-iPr-(85:15)	138	(U5), Bn, Ag		präp. Pchr. AO
	AC 35–104						
	0,746	23–25	Chf-iPr-(85:15)	29	(T)		n.w.u.
		26–39	Chf-iPr-(85:15)	132	T	42 T	
AG	V 76–90	1–27	Chf-iPr-(85:15)	128	–		n.w.u.
	W 49–52	28–32	Chf-iPr-(85:15)	276	Ab, (Des-Bt)	101 Ab	
	AC 105–262	39–51	Chf-iPr-(85:15)	262	(Ab), Des-Bt	61 Des-Bt	
	2,18						

[27]) Zusammen mit Kristallen aus Fr. Z 24–27.
[28]) Zusammen mit Kristallen aus ML von Fr. Y 24–29.

Tabelle 8 (Fortsetzung)

Chromat. Nr.	Eingesetzte Substanz in g	Fraktions-Nr.	Eluiermittel	Eindampfrückstand			Weitere Verarbeitung
				Menge in mg	Flecke im Pchr[25])	Kristalle in mg	
AG	SiO_2 350	52–58	Chf-iPr-(85:15)	109	(T), Des-Bt		präp. Pchr. AM
		59–70	Chf-iPr-(85:15)	95	Des-C, Des-Bt, H, G		präp. Pchr. AP
		71–84	Chf-iPr-(85:15)	160	Des-C, H, G		präp. Pchr. AL
		85–110	Chf-iPr-(85:15)	100	Des-C, H, G		n.w.u.
		111–130	Chf-iPr-(85:15)	30	Des-Bt, G, U8		präp. Pchr. AN
		131–192	Chf-iPr-(85:15)	132	Des-Ct, (U8)		präp. Pchr. AJ
AH	V 91–99	1–12	Chf-iPr-(85:15)	–			
	W 53–56ML	13–24	Chf-iPr-(85:15)	28	–		n.w.u.
	W 57–63	25–40	Chf-iPr-(85:15)	112	(G), U8		präp. Pchr. AN
	U 8–32ML	41–46	Chf-iPr-(85-15)	59	H, G		n.w.u.
	U 33–38	47–72	Chf-iPr-(85:15)	412	(H), G	193 G	
	1,866	73–108	Chf-iPr-(85:15)	123	G, U8		n.w.u.
	SiO_2 350	109–140	Chf-iPr-(85:15)	66	Des-Ct, G		präp. Pchr. AJ
		141–190	Chf-iPr-(85:15)	606	Des-Ct u. stationär		n.w.u.

b) *Bufadienolide.* In allen Fällen wurden die krist. Präparate mit authentischem Material durch direkten Vergleich der Laufstrecke im Pchr (Fig. 2–6), Färbung mit $SbCl_3$ (Tab. 2) und Mischprobe identifiziert. Bei der Beschreibung der Präparate werden nur zusätzliche Kriterien erwähnt.

Resibufogenin (*R*) **1**. Das amorphe Präparat (vgl. präp. Pchr AD) wurde durch das krist. O-Acetylderivat charakterisiert.

3-O-Acetylresibufogenin (*Ac-R*). 46 mg Präparat R gaben nach üblicher Acetylierung 51 mg neutrales Rohprodukt. Aus Ae nach Rekristallisation farblose Prismen, beim Erhitzen Trübung bei 167°, Smp. 211–228°, $[\alpha]_D^{22} = -0{,}7° \pm 2°$ ($c = 1{,}04$).

Cinobufagin (*C*) **3**. Aus An-Ae farblose, rhombisch begrenzte Kristalle, Doppel-Smp. 167–170°/210–213°, $[\alpha]_D^{22} = -3{,}2° \pm 2°$ ($c = 0{,}93$).

3-O-Acetylcinobufagin (*Ac-C*). 45 mg krist. C gaben bei der Acetylierung 52 mg amorphes Rohprodukt. Aus Ae farblose, wollige Nädelchen, Smp. 197–201°, $[\alpha]_D^{21} = -0{,}6° \pm 2°$ ($c = 1{,}03$).

Bufalon (*U4*) **4**. Aus An zu Büscheln vereinigte, farblose Nadeln, Smp. 219–234° (Sintern ab 210°), $[\alpha]_D^{23} = +2{,}9° \pm 3°$ ($c = 0{,}7$). Auch nach IR.-Spektrum (in CH_2Cl_2) identisch mit authentischem, teilsynthetisch bereitetem Material.

Bufotalon (*U3*) **5**. Aus An farblose Nadeln, Smp. 263–274°, $[\alpha]_D^{24} = +5{,}7° \pm 4°$ ($c = 0{,}45$). Auch nach IR.-Spektrum (in CH_2Cl_2) sowie Protonenresonanzspektrum[9]) (in $CDCl_3$) identisch mit authentischem, teilsynthetisch bereitetem Material.

Bufalin (*B*) **6**. Aus An farblose, kurze, dicke Prismen, Smp. 232–241°, $[\alpha]_D^{22} = -9{,}4° \pm 2°$ ($c = 1{,}02$).

3-O-Acetylbufalin (*Ac-B*). 91 mg krist. B gaben 99 mg rohes O-Acetylderivat. Aus An farblose Prismen, Smp. 231–244°, $[\alpha]_D^{22} = -5{,}6° \pm 2°$ ($c = 1{,}10$).

3-epi-Bufalin (*U2*) **7**. Aus An farblose, zu Rosetten vereinigte Nädelchen, Smp. 259–269°, $[\alpha]_D^{23} = -1{,}5° \pm 2°$ ($c = 1{,}04$); $[\alpha]_D^{24} = -12{,}4° \pm 3°$ ($c = 0{,}7$ in Me). Auch nach IR.-Spektrum (in CH_2Cl_2 sowie fest in KBr) identisch mit authentischem, teilsynthetisch bereitetem Material.

3-O-Acetyl-3-epi-bufalin (*Ac-U2*). 10 mg krist. U2 gaben 10,5 mg acetyliertes Rohprodukt Aus An-Ae (nach Impfen!) farblose Nadeln, Smp. 230–235°.

Tabelle 9. *Präparative Papierchromatographien* [22]

Chromat. Nr.	Eingesetzte Substanz in g	System Zahl der Papierblätter Laufzeit	Eluierte Zone	Eindampfrückstand Menge in mg	Flecke im Pchr[25])	Kristalle in mg	Bemerkungen und weitere Verarbeitung
AD	AA 17–29 0,505	Be-Cy-(1:4)/Fmd 45 Blatt 10–12 Std.	1 2 3	74 82 5	R C U7	 40 C 	Endprod. amorph Endprod. amorph
AE	Y 4–14 Z 8–16 0,183	Be-Cy-(1:1)/Fmd 25 Blatt 10 Std.	1 2	28 16	U3 U4	12 U3 8,5 U4	
AJ	AH 109–140 AG 131–192 0,141	Chf/Fmd 9 Blatt $2^1/_4$ Std.	1	50	Des-Ct	18 Des-Ct	
AK	U 5–6 0,229	Chf/Fmd 15 Blatt $2^1/_2$ Std.	1	70	Ab	42 Ab	
AL	AG 71–84 0,160	Chf/Fmd 9 Blatt $2^1/_2$ Std.	1	40	H	25 H	
AM	AG 52–58 0,109	Chf/Fmd 7 Blatt $2^1/_2$ Std.	1	27	Des-Bt	15 Des-Bt	 restliches Eluat zu AP
AN	AH 25–40 AG 111–130 0,142	Chf/Fmd 6 Blatt $2^1/_2$ Std.	1	12	U6		Endprod. amorph
AO	AF 14–22 0,138	Be-Chf-(7:5)/Fmd 9 Blatt 5 Std.	1 2	22 18	Bn Ag	13 Bn 	 Endprod. amorph
AP	AG 59–70 AM Rest 0,141	Be-Chf-(7:5)/Fmd 9 Blatt 4 Std.	1 2 3	11 80 56	T (T), Des-C, (Des-Bt)[29]) Des-C, Des-Bt, H, G		n.w.u. präp. Pchr. AS n.w.u.
AR	AF 9–13 0,090	Be-Chf-(7:5)/Fmd 9 Blatt $4^1/_2$ Std.	1 2 3 4	23 12 12 8	Bt U8 U5 Bn		n.w.u. Endprod. amorph Endprod. amorph n.w.u.
AS	AP 2 0,080	Be/Fmd 12 Blatt 36 Std.	1	32	Des-C	18 Des-C	

[29]) Trennung schlecht, da zu viel aufgetragen.

Cinobufotalin (*Ct*) **9**. Aus An-Ae farblose Tetraeder, Smp. 251–255°, (Sintern ab 246°), $[\alpha]_D^{23} = +9{,}8° \pm 2°$ ($c = 1{,}06$).

3-O-Acetylcinobufotalin (*Ac-Ct*). 45 mg krist. Ct gaben 49 mg acetyliertes Rohprodukt. Aus An-Ae farblose Prismen, Smp. 204–216°, $[\alpha]_D^{23} = +20{,}5° \pm 3°$ ($c = 0{,}75$).

Marinobufagin (*M*) **10**. Aus An-Ae farblose dünne Plättchen, Smp. 215–217°, $[\alpha]_D^{22} = +8{,}6° \pm 2°$ ($c = 1{,}05$).

3-O-Acetylmarinobufagin (*Ac-M*). 18 mg krist. M gaben 18 mg rohes Acetylderivat. Aus An farblose Nadeln, Smp. 191–221°, $[\alpha]_D^{23} = +28{,}9° \pm 3°$ ($c = 0{,}74$).

Bufotalin (*Bt*) **12**. Aus An farblose Prismen, Smp. 227–231°, (teilweise auch 156–158°), $[\alpha]_D^{22} = +5{,}0° \pm 2°$ ($c = 1{,}04$).

3-O-Acetylbufotalin (*Ac-Bt*). 133 mg krist. Bt gaben 140 mg acetyliertes Rohprodukt. Aus An-Ae kleine, farblose Plättchen, Smp. 247–260°, $[\alpha]_D^{23} = +5{,}5° \pm 2°$ ($c = 1{,}09$).

Subst. U5. Amorph, nicht aufgeklärt.

Bufotalinin (*Bn*) **13**. Aus An-Ae farblose Rhomboeder, Smp. 213–233°, (Gasentwicklung bei 105°), $[\alpha]_D^{23} = +19{,}2° \pm 3°$ ($c = 0{,}82$).

3-O-Acetylbufotalinin (*Ac-Bn*). 16 mg Bn (Kristall-ML) gaben 16 mg rohes Acetylderivat. Das Präparat kristallisierte nicht und war nach Pchr nicht ganz einheitlich. Der Hauptfleck zeigte gleiche Laufstrecke und gleiche Färbung mit $SbCl_3$ wie authentisches Material.

Telocinobufagin (*T*) **14**. Aus An-Ae farblose Prismen mit Doppel-Smp. 157–159°/205–206°, $[\alpha]_D^{24} = +5{,}9° \pm 2°$ ($c = 1{,}08$).

3-O-Acetyltelocinobufagin (*Ac-T*). 100 mg T (Kristall-ML) gaben 107 mg acetyliertes Rohprodukt. Aus An (nach Impfen) farblose kleine Oktaeder, Smp. 255–270°, $[\alpha]_D^{24} = +22{,}9° \pm 2°$ ($c = 1{,}05$).

Argentinogenin (*Ag*) **15**. Das Präparat blieb amorph. Die Identität ist durch folgende Befunde gut gesichert. Laufstrecke im Pchr genau gleich wie bei authentischem Material. Absorption in der Photokopie bei 300 nm. Mit $SbCl_3$ keine Färbung. Im Glührohr entsteht mit einer Spur $FeCl_3$ in Alk-W eine intensiv graublaue Färbung. Dieses Verhalten wurde bisher bei keinem anderen Bufogenin beobachtet.

Di-O-acetylargentinogenin (*Ac-Ag*). 12,5 mg amorphes Präp. Ag gaben 14 mg acetyliertes Rohprodukt. Das Präparat blieb amorph. Im Pchr zeigte es genau dieselbe Laufstrecke wie authentisches, ebenfalls amorphes Vergleichsmaterial.

Desacetylcinobufagin (*Des-C*) **2**. Aus An-Ae farblose kleine Körner, Smp. 179–181°, $[\alpha]_D^{22} = +19{,}5° \pm 2°$ ($c = 0{,}92$).

3-O-Acetylcinobufagin (*Ac-Des-C*). 17 mg krist. Des-C gaben 20 mg acetyliertes Rohprodukt. Aus An-Ae farblose Kristalle, Smp. 199–202°, $[\alpha]_D^{24} = -1{,}4° \pm 3°$ ($c = 0{,}56$). Die Identifizierung wurde mit dem O-Acetylderivat von C durchgeführt.

Desacetylbufotalin (*Des-Bt*) **11**. Aus An, dann aus Me farblose, klare Plättchen, Smp. 218–235° (Trübung bei 160–165°), $[\alpha]_D^{23} = +40{,}0° \pm 2°$ ($c = 0{,}9$).

3-O-Acetylbufotalin (*Ac-Des-Bt*). 122 mg krist. Des-Bt gaben 120 mg rohes Acetylderivat. Aus An-Ae, dann aus Me farblose Plättchen, Smp. 249–264°, $[\alpha]_D^{23} = +5{,}3° \pm 3°$ ($c = 0{,}68$).

Arenobufagin (*Ab*) **16**. Aus An grobe, farblose, zu Drusen vereinigte Prismen, Smp. 225–232°, $[\alpha]_D^{23} = +67{,}5° \pm 2°$ ($c = 1{,}02$).

Di-O-acetylarenobufagin (*Ac-Ab*). 38 mg krist. Ab gaben 43 mg rohes Acetylderivat. Aus An (nach Impfen) farblose, kurze, dicke Prismen, Smp. 228–249° (Sintern ab 200°), $[\alpha]_D^{23} = +43{,}5° \pm 2°$ ($c = 1{,}03$).

Hellebrigenin = *Bufotalidin* (*H*) **17**. Aus An farblose Plättchen mit Doppel-Smp. 153–157°/232–235°, $[\alpha]_D^{23} = +19{,}5° \pm 2°$ ($c = 1{,}01$).

3-O-Acetylhellebrigenin = *3-O-Acetylbufotalidin* (*Ac-H*). 18 mg Präp. H (Kristall-ML) gaben 15 mg rohes Acetylderivat. Aus An farblose Plättchen, Smp. 220–247° (Zers.), $[\alpha]_D^{24} = +34{,}3° \pm 3°$ ($c = 0{,}73$).

Desacetylcinobufotalin (*Des-Ct*) **8**. Aus An farblose, flache Stäbchen, Smp. 245–251° (Gasentwicklung bei 160°), $[\alpha]_D^{23} = +32{,}0° \pm 2°$ ($c = 1{,}0$ in Me).

3-O-Acetylcinobufotalin (*Ac-Des-Ct*). 29 mg Präp. Des Ct (Kristall-ML) gaben 31 mg rohes Acetylderivat. Es war nach Pchr nicht einheitlich. Der Hauptfleck zeigte gleiche Laufstrecke und Färbung mit $SbCl_3$ wie authentisches Material.

Gamabufotalin (*G*) **18**. Aus Me-Ae farblose Stäbchen. Schwer löslich in Chf und An. Smp. 260–269°, $[\alpha]_D^{23} = -13{,}7° \pm 2°$ ($c = 1{,}0$ in Me).

Di-O-Acetylgamabufotalin (*Ac-G*). 134 mg krist. G gaben 165 mg acetyliertes Rohprodukt. Aus An farblose Nädelchen, Smp. 253–264°, $[\alpha]_D^{24} = -8° \pm 2°$ ($c = 1{,}08$).

Die Substanzen U6, U7 und U8 waren amorph und wurden nicht aufgeklärt.

SUMMARY

In the skin of the Japanese toad *Bufo formosus* BOULENGER three sterols and 19 bufadienolides have been traced by thin layer and paper chromatography. Combining different preparative chromatographic methods a complete qualitative separation could be achieved. From 490 animals the following amounts of the 3 sterols and 16 crystalline bufadienolides were obtained (amounts in mgs): cholesterol (ca. 20000; only a fraction was purified), 7α-hydroxy-cholesterol (1.5, identification tentative), 7β-hydroxy-cholesterol (8.5), cinobufagin (40), bufalone (8.5), bufotalone (12), bufalin (353), 3-epi-bufalin (32), cinobufotalin (54), marinobufagin (45), bufotalin (1357), bufotalinin (13), telocinobufagin (42), desacetyl-cinobufagin (18), desacetyl-bufotalin (76), arenobufagin (143), hellebrigenin = bufotalidin (25), desacetyl-cinobufotalin (18), gamabufotalin (2136). The following three were obtained in amorphous form: resibufogenin (74, identified as crystalline O-acetyl-derivative), argentinogenin (14) and U5 (7, not identified).

Ten of the mentioned bufadienolides have already been isolated by former workers from *Bufo formosus*.

LITERATURVERZEICHNIS

[1] E. ISELI, EK. WEISS, T. REICHSTEIN & K. K. CHEN, Helv. *47*, 116 (1964).
[2] O. GESSNER, «Tierische Gifte» in HEFFTERS Handb. d. exptl. Pharmakologie Erg.-Werk Bd. VI, 38 ff (J. Springer, Berlin 1938). Teilweise auch als *Bufo vulgaris formosus*, *Bufo bufo formosus* KOTAKE und *Bufo bufo japonicus* bezeichnet.
[3] H. WIELAND & F. VOCKE, Liebigs Ann. Chem. *481*, 215 (1930).
[4] S. OHNO, T. OHMOTO & M. KOMATSU, Yakugaku Zasshi *81*, 1339 (1961); Chem. Abstr. *56*, 7391 (1962).
[5] L. F. FIESER & M. FIESER, «Steroide», übersetzt von H. GRÜNEWALD, Verlag Chemie, Weinheim 1961.
[6] M. KOTAKE, Liebigs Ann. Chem. *465*, 11 (1928).
[7] M. KOTAKE, Sci. Papers Inst. physic. chem. Research *9*, 233 (1928); Chem. Abstr. *23*, 1413 (1929).
[8] R. HÜTTEL & H. BEHRINGER, Z. physiol. Chem. *245*, 175 (1937).
[9] M. KOMATSU, Itsuu Kenkyusho Nempo *9*, 45 (1958); Chem. Abstr. *54*, 2582i (1960).
[10] M. BARBIER, M. BHARUCHA, K. K. CHEN, V. DEULOFEU, E. ISELI, HERB. JÄGER, M. KOTAKE, R. REES, T. REICHSTEIN, O. SCHINDLER & EK. WEISS, Helv. *44*, 362 (1961).
[11] S. OHNO & T. OHMOTO, Yakugaku Zasshi *81*, 1341 (1961); Chem. Abstr. *56*, 7391i (1962).
[12] S. OHNO, M. KOMATSU & T. OHMOTO, Yakugaku Zasshi *81*, 1345 (1961); Chem. Abstr. *56*, 7391 (1962).
[13] E. STAHL, Angew. Chem. *73*, 646 (1961), u. frühere Lit. daselbst; K. RANDERATH, «Dünnschicht-Chromatographie», Verlag Chemie, Weinheim 1962; «Dünnschicht-Chromatographie», herausgegeben von E. STAHL, Springer-Verlag, Berlin 1962; Bufogenine vgl. R. ZELNIK & L. M. ZITI, J. Chromatogr. *9*, 371 (1962).
[14] R. NEHER & A. WETTSTEIN, Helv. *34*, 2278 (1951).
[15] O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, Helv. *34*, 108 (1951).
[16] H. HEGEDÜS, CH. TAMM & T. REICHSTEIN, Helv. *36*, 357 (1953).
[17] W. ARNOLD, R. BÜHRER, J. v. EUW, E. LÜSCHER, O. SCHINDLER, K. STICH, P. ZOLLER & T. REICHSTEIN, Helv. *46*, 178 (1963).

[18] a) R. Bolliger & K. Meyer, Helv. *40*, 1659 (1957); b) J. P. Ruckstuhl & K. Meyer, Helv. *40*, 1270 (1957); c) H. R. Urscheler, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv. *38*, 883 (1955); d) H. Schröter, Ch. Tamm, T. Reichstein & V. Deulofeu, Helv. *41*, 140 (1958).
[19] H. Linde & K. Meyer, Helv. *42*, 807 (1959).
[20] R. Rees, O. Schindler, V. Deulofeu & T. Reichstein, Helv. *42*, 2400 (1959).
[21] G. R. Duncan, J. Chromatogr. *8*, 37 (1962).
[22] E. v. Arx & R. Neher, Helv. *39*, 1664 (1956).
[23] M. S. Ragab, H. Linde & K. Meyer, Helv. *45*, 1794 (1962) und frühere Lit. daselbst.
[24] M. Barbier, H. Schröter, K. Meyer, O. Schindler & T. Reichstein, Helv. *42*, 2486 (1959).
[25] a) J. Schmutz, Helv. *32*, 1442 (1949); b) A. Katz, Helv. *40*, 831 (1957).
[26] H. Heymann & L. F. Fieser, Helv. *35*, 631 (1952); W. Klyne, Helv. *35*, 1224 (1952).
[27] L. F. Fieser, J. E. Herz, M. W. Klohs, M. A. Romero & T. Utne, J. Amer. chem. Soc. *74*, 3309 (1952).
[28] L. Ruzicka, V. Prelog & E. Tagmann, Helv. *27*, 1149 (1944).
[29] H. Linde & K. Meyer, Pharmac. Acta Helv. *33*, 327 (1958).
[30] K. Meyer, Helv. *35*, 2444 (1952).
[31] P. Hofer, H. Linde & K. Meyer, Helv. *43*, 1955 (1960).
[32] K. Meyer, Pharmac. Acta Helv. *24*, 222 (1949).
[33] K. Meyer, Helv. *32*, 1238 (1949).
[34] K. Meyer, Helv. *32*, 1993 (1949).
[35] Ch. Tamm & A. Gubler, Helv. *42*, 473 (1959).
[36] Ch. Tamm, Helv. *43*, 338 (1960).
[37] F. Bernoulli, H. Linde & K. Meyer, Helv. *45*, 240 (1962).
[38] H. Schröter, R. Rees & K. Meyer, Helv. *42*, 1385 (1959), u. frühere Lit. daselbst.
[39] K. Meyer, Helv. *34*, 2147 (1951).
[40] H. Wieland & F. J. Weil, Ber. deutsch. chem. Ges. *46*, 3315 (1913); H. Wieland, Sitzungs ber. bayr. Akad. d. Wiss. *1920*, 329; Chem. Zbl. *1921*, I, 100.
[41] H. Schröter, Ch. Tamm & T. Reichstein, Helv. *41*, 720 (1958).
[42] K. Meyer, Helv. *32*, 1593 (1949).
[43] P. Hofer & K. Meyer, Helv. *43*, 1495 (1960).
[44] P. Hofer, H. Linde & K. Meyer, Tetrahedron Letters Nr. 7, 8 (1959); Helv. *43*, 1950 (1960).
[45] V. Deulofeu, Bol. Soc. quim. Peru *6*, Nr. 3, 27 (1940); Chem. Abstr. *35*, 1427 (1941); V. Deulofeu, E. Duprat & R. Labriola, Nature *145*, 671 (1940).
[46] E. Duprat, Thesis Facultad de Ciencias Exact. Fisic. Nat., Buenos Aires 1941.
[47] K. Meyer, Helv. *32*, 1599 (1949).
[48] W. Bergmann, J. biol. Chemistry *107*, 527 (1934).
[49] T. Reichstein & C. W. Shoppee, Discuss. Farad. Soc. *7*, 305 (1949).
[50] S. A. Simpson, J. F. Tait, A. Wettstein, R. Neher, J. v. Euw, O. Schindler & T. Reichstein, Helv. *37*, 1163 (1954).

Curriculum vitae

Am 7. Juli 1934 wurde ich als Sohn des kaufmännischen Angestellten Fritz Iseli und seiner Gattin Anna, geb. Mösle, geboren.

Während 4 Jahren besuchte ich die Primarschule und von 1945 an das Realgymnasium Basel, wo ich im Frühjahr 1953 die Maturitätsprüfung Typ B bestand.

Im Sommersemester 1953 immatrikulierte ich mich an der Universität Basel in der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät mit Hauptfach Chemie.

Das Vorexamen in anorganischer Chemie bei Herrn Prof. Dr. H. Erlenmeyer legte ich 1957 ab, das Vorexamen in organischer Chemie im Herbst 1959 bei den Herren Proff. Dr. C. Grob und Dr. M. Brenner. Im gleichen Jahr bestand ich auch das Vorexamen in Farbenchemie bei Herrn Prof. Dr. R. Wizinger.

Ich legte folgende Nebenfachexamina ab:
1957 Botanik bei Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber.
1960 Bakteriologie-Hygiene bei Herrn Prof. Dr. J. Tomcsik.
1962 Physikalische Chemie bei Herrn Prof. Dr. W. Kuhn.

Die Dissertation begann ich 1960 bei Herrn Prof. Dr. T. Reichstein und beendete sie 1963.

Im Verlauf meines Studiums besuchte ich Vorlesungen und Praktika der folgenden Herren Professoren und Privatdozenten: M. Brenner, H. Buchner, H. Dahn, H. Erlenmeyer, S. Fallab, M. Geiger-Huber, C. Grob, H. Hediger, P. Huber, J. Jenny, W. Kuhn, H. Labhard, A. Portmann, T. Reichstein, R. Schenkel, O. Schindler, M. Stähelin, Ch. Tamm, J. Tomcsik, R. Wizinger.